



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/24504 (43) Date de publication internationale: 14 septembre 1995 (14.09.95)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00259</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 mars 1995 (06.03.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/02603 7 mars 1994 (07.03.94) FR</p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur-Calmette, F-59019 Lille Cédex (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): AMOUYEL, Philippe [FR/FR]; 75, rue du Quesne, F-59700 Marcq-en-Barœul (FR). CHARTIER-HARLIN, Marie-Christine [FR/FR]; 53/27, chemin des Crieurs, F-59650 Villeneuve-d'Ascq (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: COMBINED USE OF GENETIC MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE, DIAGNOSTIC KIT AND METHOD</p> <p>(54) Titre: MARQUEURS GENETIQUES UTILISES CONJOINTEMENT POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, METHODE ET KIT DE DIAGNOSTIC</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Combined use of at least two genetic markers selected from apolipoprotein E, D19S178 and apolipoprotein CII, for the diagnosis of Alzheimer's disease, especially apolipoprotein ε4, long apolipoprotein CII (30+/-3 repeat patterns (CA) and short D19S178 (less than 167+/-4 nucleotides) alleles. The invention also concerns a method for the diagnosis of Alzheimer's disease and a kit for carrying out said method.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet l'utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, en particulier les allèles APO ε4, APO CII long (30+/-3 motifs répétitifs (CA)) et D19S178 pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'un kit pour la mise en œuvre du procédé.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

Marqueurs génétiques utilisés conjointement pour
le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, méthode et kit de dia-
gnostic.

La présente invention concerne des marqueurs génétiques utilisés conjointement pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une pathologie encéphalique caractérisée par une démence précoce avec une perte de neurones corticaux associée à des plaques de β -amyloïde, des enchevêtements de neurofibrilles et dans la plupart des cas une angiopathie amyloïde. Il existe de fortes présomptions pour une influence génétique dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (WO 94/01772).

Cette composante génétique a été mis en évidence depuis de nombreuses années par des observations indirectes qui suggèrent une hérédité sur le mode autosomique dominant et une pénétrance dépendante de l'âge pour expliquer les liens familiaux entre des individus atteints par la maladie. Des études de génétique moléculaire récentes ont permis d'isoler des gènes putatifs de la maladie d'Alzheimer par la recherche de marqueurs génétiques polymorphes spécifiques de chromosomes (Bird et al., 1989, Neurobiology of Aging 10, 432-434).

Trois localisations chromosomiques ont été décrites comme étant impliquées dans les formes familiales à survenue précoce (âge de survenue inférieur à 60 ans) : le chromosome 21, le chromosome 14 et le chromosome 19. Deux études de liaison ont suggéré que la région chromosomique 19q13.2 était associée à des formes de maladie d'Alzheimer familiales à survenue tardive (Pericak-Vance et al, Am. J. Hum. Genet. (1991), 48, 1034-1050 ; Schellenberg et al., Ann. Neurol. (1992), 31, 223-227). Au sein de cette région chromosomique, le groupe de gènes d'apolipoprotéines (APO) E-CI-CI'-CII est une

zone candidate. Parmi les produits de ces gènes, l'apolipoprotéine E (APOE) est particulièrement impliquée dans le système nerveux : APOE est présente dans les plaques séniles et possède une affinité de liaison avec le peptide β -A4. Strittmatter et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1993) 90, 177-181) ont décrit une fréquence augmentée de l'allèle $\epsilon 4$ du gène APOE dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer à survenue tardive. Cette observation a été confirmée pour les formes familiales (Corder et al., Science (1993), 261, 921-923) et les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer (Corder et al., Science (1993), 261, 921-923 ; Saunders et al., Neurology -(1993), 13, 1467-1472).

D'autre part, Schellenberg et al. (Ann. Neurol. 1992, 31:223-227) ont rapporté une association génétique entre l'allèle F du gène de l'apolipoprotéine CII (allèle du polymorphisme de longueur de fractions de restriction de TaqI (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism)) et la forme familiale de la maladie d'Alzheimer.

Les auteurs de la présente invention ont réalisé une étude portant sur deux populations d'origine différentes atteintes l'une d'une forme à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer (après 65 ans), l'autre d'une forme à survenue précoce de la maladie d'Alzheimer (avant 65 ans), qui a permis d'établir une augmentation significative dans les deux groupes d'au moins deux des marqueurs génétiques suivants : allèle APOE $\epsilon 4$, allèle D19S178 court et allèle APO CII long.

La localisation sur le chromosome 19 des marqueurs APOE, APO CII (APO C2) et D19S178 est connue et décrite notamment par Williamson et al. (Cyto Genetic and Cell Genetic 1991, vol. 58, p. 1678).

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs

génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, les marqueurs génétiques étant de préférence constitués par APOE et D19S178 et/ou APO CII, de préférence encore par APOE, 5 D19S178 et APO CII.

Les marqueurs génétiques utilisés sont avantageusement l'allèle APOE ε4, l'allèle D19S178 court et l'allèle APO CII long.

Le gène APOE possède trois allèles : ε2, ε3 10 et ε4.

Par allèle APO CII long, on entend un allèle comprenant plus de 30 ± 3 , de préférence plus de 30 répétitions consécutives des bases cytosine-adénine.

Par allèle D19S178 court, on entend un allèle 15 comprenant moins de 167 ± 4 , de préférence moins de 167 nucléotides.

L'invention a également pour objet un procédé de diagnostic de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce que l'on recherche dans un échantillon biologique d'un patient la présence de deux au moins des marqueurs suivants : allèle APOE ε4, allèle D19S178 court et allèle APO CII long.

La méthode selon l'invention comprend avantageusement les étapes suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon biologique contenant de l'ADN avec un couple d'amorces spécifiques permettant l'amplification de tout ou d'une partie des gènes APOE, D19S178 et/ou APO CII, l'ADN humain contenu dans l'échantillon ayant été éventuellement rendu accessible à l'hybridation et dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN humain contenu dans l'échantillon biologique ;

b) amplification de l'ADN humain ;

c) révélation des produits d'amplification 35 par les techniques appropriées ;

d) détection de la présence éventuelle des allèles APOE ε4, D19S178 court et APO CII long par les techniques appropriées.

5 Par diagnostic, au sens de la présente invention, on entend la confirmation de la présence d'au moins deux marqueurs choisis parmi ceux décrits ci-dessus chez des patients dont le tableau clinique fait état d'une symptomatologie pouvant être attribuée à la maladie
10 d'Alzheimer, ou encore une probabilité accrue chez des sujets de développer la maladie d'Alzheimer par rapport à l'ensemble d'une population, l'accroissement de la probabilité étant d'au moins un facteur 4.

15 L'échantillon biologique peut être le sang total, la fraction leucocytaire du sang ou encore un tissu à partir duquel de l'ADN peut être extrait, ou un fluide biologique.

20 Les amorces spécifiques utilisées dans le cadre de la présente invention peuvent être notamment celles décrites dans Roppers et al. (1991), Cytogenet. Cell Genet. 58, 751-784) pour D19S178, Hixson et al. (1990), J. Lipid. Res. 31, 545-548 pour APOE et Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396 pour APO CII.

25 D'autres amorces peuvent convenir, le critère de sélection des amorces étant qu'elles permettent l'amplification des parties des gènes APOE, D19S178 et APO CII comportant les polymorphismes respectifs : région 112-158 de APOE, extrémité 5' de APO CII.

30 Les allèles recherchés, notamment D19S178 et APO CII long, peuvent être mis en évidence par détermination de la longueur des fragments amplifiés, par exemple par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par détermination de la séquence du fragment amplifié.

35 Les allèles recherchés, notamment APO ε4, peuvent également être détectés par la technique d'ana-

lyse de polymorphisme conformationnel de simples brins ("Single-Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) telle que décrite par Masato Orita et al., ou encore par hybridation de sonde à l'aide d'une sonde spécifique.

5 La présente invention a également pour objet un nécessaire pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, dans un échantillon comprenant les éléments suivants :

- des couples d'amorces spécifiques des gènes APOE, D19S178 et APO CII,
- les réactifs nécessaires pour effectuer une amplification d'ADN,
- éventuellement les réactifs permettant la détection des allèles APOE ε4, D19S178 court et/ou APO CII long, par exemple des réactifs nécessaires à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des fragments après migration, notamment des sondes spécifiques de l'allèle APO ε4.

On rapportera ci-après les résultats de l'étude des inventeurs auteurs de la présente invention, montrant l'implication des marqueurs APOE, APO CII et D19S178 dans la fréquence de survenue de la maladie d'Alzheimer.

L'étude a porté sur deux groupes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un groupe français composé de 36 patients atteints d'une forme à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer (78 ± 9 ans ; intervalle 65-91 ans) et un groupe britannique composé de 34 patients présentant une forme à survenue précoce de la maladie d'Alzheimer (57 ± 4 ans ; intervalle : 49-64 ans) diagnostiquées par la clinique.

Ces deux groupes ont été comparés à deux groupes témoins de mêmes origine et âges, composés respectivement de 38 et 36 sujets dont l'environnement était identique à celui des patients atteints de la

maladie d'Alzheimer.

L'ADN génomique des patient a été extrait des leucocytes selon la méthode décrite par Marcadet et al. (Standardized Southern-Blot Workshop Technique-Histocompatibility Testing, Springer Verlag, New-York, Vol. 1).
5 L'ADN génomique a été amplifié par PCR à l'aide d'un appareil d'amplification Perkin-Elmer-Cetus.

Cinq marqueurs localisés dans la région chromosomique 19q13.2 ont été étudiés comme décrit dans
10 les références correspondantes : deux marqueurs anonymes contenant des motifs (CA)_n, D19S47 (référencé sous Mfd 9 (Weber et al. (1989), Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396)) et D19S178 (référencé sous Mfd 139 (Ropers et al. (1991) Cytogenet. Cell Genet. 58, 751-784)), le polymorphisme
15 APOE (Hixson et al. (1990) J. Lipid. Res. 31, 545-548), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) pour HpaI de l'extrémité 5' du locus du gène Apo CI (Nillesen et al. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 3428) et le polymorphisme de motifs répétitifs (CA)_n dans le
20 gène APO CII (référencé sous Mfd 5) (Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec un logiciel SAS version 6,04. Des analyses "Univariates" ont été réalisées à l'aide du test χ^2 de Pearson et du test exact de Fisher si nécessaire. Compte tenu de la rareté de la fréquence de certains allèles observée pour des polymorphismes microsatellites, les allèles ont été regroupés en deux groupes en fonction de leur nombre de nucléotides. Ainsi, D19S178 a été partagé en allèles longs (167 nucléotides et au-delà) et allèles courts (moins de 167 nucléotides), les allèles de l'extrémité 5' de APO CII à motifs répétitifs ont été divisés en allèles longs (30 motifs répétitifs et au-delà) et allèles courts (moins de 30 motifs répétitifs).
30 35 Les fréquences alléliques ont été calculées

par comptage des allèles.

Les résultats recueillis ont été traités par informatique en utilisant un modèle de régression logistique par étape à l'aide de tests statistiques de vraisemblance comme décrit par Breslow N.E. et al., Statistical Methods in Cancer Research, Vol. 1, pp. 192-247. L'analyse des déséquilibres de liaison a été faite comme décrit par Thompson E.A. et al., Am. J. Hum. Genet., 42, 113-124 et Hill, W.G., 1974, Hereditary, 33, 229-239.

Les fréquences des marqueurs D19S178, APOE, APO CI et APO CII ont été estimées à l'aide de l'algorithme décrit par McLean et Morton, Genet. Epidemiol. 2, 263-272, mis sous forme de programme informatique, comme décrit par Cox et al., Am. J. Hum. Genet., 43, 495-501.

Les fréquences estimées ont été comparées à celles attendues sur la base de l'équilibre du χ^2 de Pearson ou du test exact de Fischer.

Les résultats sont rapportés aux Tableaux I à IV ci-après.

Le tableau I rapporte les distributions de fréquence allélique des polymorphismes génomiques pour des sujets sporadiques atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins.

Aucune différence significative n'apparaît entre les sujets et les témoins dans la distribution de l'allèle D19S47 pour les différentes populations. Dans la population à survenue tardive de la maladie, les fréquences des polymorphismes des gènes APOE et APO CII étaient significativement différentes entre les sujets et les témoins : l'allèle APOE ε4 et les allèles APO CII longs étaient observés plus fréquemment chez les sujets à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer que chez les témoins.

Les mêmes analyses ont été réalisées pour une

population indépendante du Royaume-Uni de sujets sporadiques à survenue précoce par rapport à des témoins. Cette population a été étudiée pour les deux limites d'âge de survenue généralement acceptées, c'est-à-dire moins de 5 65 ans et moins de 60 ans. Pour le groupe de sujets dont l'âge de survenue était inférieur à 65 ans, les distributions alléliques des polymorphismes des gènes D19S178, APOE et APOCI étaient significativement différentes entre les sujets et les témoins : les allèles D19S178 courts, 10 l'allèle APOE ε4 et la présence du site de restriction de HpaI dans APO CI (allèle 2) ont été plus fréquemment observés chez les malades où la survenue de la maladie était précoce que chez les témoins. Pour les groupes de sujets avec un âge de survenue de la maladie inférieure 15 à 60 ans, les distributions alléliques des polymorphismes des gènes D19S178, APOE et APO CI étaient similaires à celles du groupe de sujets avec un âge de survenue de la maladie inférieur à 65 ans.

Pour les analyses suivantes, la limite de séparation en fonction de l'âge entre le groupe à survenue précoce et le groupe à survenue tardive était de 65 ans.

La fréquence observée pour l'allèle APOE ε4 dans le groupe de malades à survenue précoce n'était pas 20 significativement différente de celle observée dans le groupe de malades à survenue tardive, et dans les deux populations, l'allèle APOE ε2 était rare chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer.

Une corrélation inverse entre l'âge de 25 survenue et le nombre de copies de l'allèle APOE ε4 était observée dans la population à survenue tardive ($p < 0,026$), mais non dans la population à survenue précoce. Les âges moyens de survenue des sujets ayant deux allèles APO ε4, un allèle ε4 ou sans l'allèle APO ε4 étaient 30 respectivement de 70,5, 75,0 et 81,2 ans dans le groupe

à survenue tardive, et 58,5, 56,6 et 57,3 ans dans le groupe à survenue précoce.

5 Les résultats d'études de déséquilibre de liaison deux à deux entre les polymorphismes D19S178, APOE, APO CI et APO CII sont rapportés au Tableau II.

Aucune déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'était observée. Un déséquilibre de liaison complet était retrouvé entre l'allèle APO ε4 et l'allèle 2 du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de APO CI dans les deux populations.

10 Dans la population témoin, un déséquilibre de liaison non significatif était retrouvé entre les polymorphismes D19S178 et APOE et à l'intérieur de l'ensemble APOE-CI-CI'-CII.

15 Les fréquences haplotypiques des 4 marqueurs (D19S178, APOE, APO CI et APO CII) ont été estimées comme rapporté au Tableau III ci-après.

Parmi les 24 haplotypes théoriques, seuls 15 étaient retrouvés avec l'algorythme par la méthode décrite par McLean et Morton. Certains haplotypes étaient observés seulement chez les malades (n° 1, 2 et 7) et d'autres seulement chez les témoins (n° 12 et 13) à la fois dans la population à survenue tardive et celle à survenue précoce. L'haplotype n° 10 était deux fois plus fréquent dans la population de malades à survenue tardive que dans la population à survenue précoce.

20 Le contenu d'informations du polymorphisme (Polymorphism Information Content (PIC)) et le degré d'hétérozygotie obtenus en combinant ces 4 marqueurs étaient élevés dans les deux groupes.

25 Les différences dans la distribution des fréquences d'haplotypes estimées entre les malades et les témoins ont été testées à l'aide du test de rapport de probabilité (likelihood ratio test) avec un nombre de degré de liberté égal à 15. Les résultats étaient de 88,4

et 93,2 respectivement pour le groupe de malades à survenue tardive et le groupe de malades à survenue précoce.

5 Pour estimer la tendance à développer la maladie ("odds ratio") pour les porteurs d'au moins un des allèles des différents génotypes, on a utilisé des modèles de régression logistique multiple par étapes, qui ont été adaptés aux observations.

10 Dans le groupe à survenue tardive, les "odds ratios" estimés étaient de 6,49 pour l'allèle APOE ε4 (intervalle de confiance à 95% = [1,68 ; 25,03]), 0,10 pour l'allèle APOE 2 (intervalle de confiance à 95% = [1,19 ; 10,70]).

15 Dans le groupe à survenue précoce, les "odds ratios" estimés obtenus étaient de 3,80 pour l'allèle APO ε4 (intervalle de confiance à 95% = [0,01 ; 0,85]) et 4,44 pour les allèles courts de D19S178 (intervalle de confiance à 95% = [1,27 ; 15,49]).

20 L'odds ratio (approximation du risque) ajusté pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 de développer une maladie d'Alzheimer sporadique de type à survenue précoce ou à survenue tardive était de 4.10 (intervalle de confiance à 95% = [1.84 ; 9.16]), comme estimé dans un modèle de régression, logistique adapté 25 pour les données se rapportant à la population totale.

Pour les porteurs d'au moins un allèle, APOE ε2, l'odds ratio était de 0.11 (intervalle de confiance à 95% = [0,02 ; 0,50]), suggérant ainsi un effet protecteur de cet allèle.

30 Le risque de développer une maladie d'Alzheimer pour les porteurs d'au moins un allèle ε4 et d'au moins un des deux marqueurs : allèle D19S178 court et allèle APO CII long est rapporté au tableau IV ci-dessous.

35 Dans les deux populations, les risques "odds

"ratios" étaient significativement augmentés lorsque l'un de ces deux marqueurs était considéré en même temps que l'allèle APOE ε4.

Par exemple, le risque de déclarer une maladie d'Alzheimer à survenue tardive pour un sujet porteur d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle APO CII long est maximal, cette configuration n'étant jamais retrouvée chez les témoins. Dans cette même population à début tardif, pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle D19S178 court, l'odds ratio s'élève à 14 (14.23). Cet odds est également augmenté (supérieur à 8 (8.68)) pour ces mêmes allèles dans le cas d'une maladie d'Alzheimer à début précoce.

Dans l'ensemble de la population, le risque de développer une maladie d'Alzheimer indépendamment de l'âge de survenue est augmenté pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle D19S178 court comme en témoigne l'élévation de l'odds ratio supérieur à 12 (12.46) ainsi que pour les porteurs d'au moins un APOE ε4 et d'au moins un allèle APO CII long (odds ratio supérieur à 9 (9,72)).

TABLEAU 1

Distribution de fréquence allélique de polymorphismes génomiques pour des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins

	D19S178			APOE			APOCI			APOCII		
	Allèle ^a	M.A.	Témoin	Allèle	M.A.	Témoin	Allèle ^a	M.A.	Témoin	Allèle ^a	M.A.	Témoin
Survenue tardive Age de survenue ≥ 66	n	.72	.76	nS	.72	.76	n	.72	.76	n†	.72	.76
	Court	.43	.38	2	.01	.15	1	.71	.79	Court	.62	.78
	Long	.57	.62	3	.75	.80	2	.29	.21	Long	.38	.22
Survenue précoce Age de survenue < 66	n†	.68	.72	n‡	.68	.72	n†	.68	.72	n	.68	.72
	Court	.57	.40	2	.01	.14	1	.56	.72	Court	.75	.75
	Long	.43	.60	3	.70	.72	2	.44	.28	Long	.25	.25
Survenue précoce Age de survenue < 60	n	.50	.72	n#	.50	.72	n	.50	.72	n	.50	.72
	Court	.56	.40	2	.02	.14	1	.56	.72	Court	.72	.75
	Long	.44	.60	3	.66	.72	2	.44	.28	Long	.28	.25

M.A. : Sujets atteints de la Maladie d'Alzheimer
n = nombre de chromosomes

• = Polymorphisme d'unités répétitives (CA)n de D19S178
Court = nombre de nucléotides < 167 ; Long = nombre de nucléotides ≥ 167

* Site de restriction APO CI Hpa 1 = absence de site de restriction, 2 = présence de site de restriction

† Polymorphisme d'unités répétitives APO CII (CA)n
Court = nombre d'unités répétitives < 30 ; Long = nombre d'unités répétitives ≥ 30

M.A. contre témoins = † p < .04 ; #p < .01 ; § p < .004 ; \$ p < .0001

TABLEAU II**Déséquilibres de liaisons deux à deux dans la région chromosomale 19Q13.2**

Sujets survenue tardive D19S178	APOE	APOCI	APOCII	Témoin			
				survenue précoce D19S178	APOE	APOCI	APOCII
D19S178	---	.092	-.069	.040	D19S178	---	.165
APOE 3	16.5	---	0.89*	.254	APOE	100.0	---
APOCI	12.7	98.9	---	.348	APOCI	16.3	100.0
APOCII	3.7	33.9	42.3	---	APOCII	10.6	100.0

Sujets survenue précoce D19S178	APOE	APOCI	APOCII	Témoin			
				survenue tardive D19S178	APOE	APOCI	APOCII
D19S178	---	.171	-.033	.030	D19S178	---	-.141
APOE	13.0	---	.726*	.114	APOE	42.9	---
APOCI	4.3	100.0	---	.050	APOCI	0.8	100.0
APOCII	1.9	10.4	3.3	---	APOCII	9.6	100.0

Polymorphisme APOE analysé en tant que marqueur bialélique (allèle 4 contre allèle 2 ou 3)

Au-dessus de la diagonale ▲ représentant le coefficient standardisé de déséquilibre de liaisons

Au-dessous de la diagonale D' représentant le pourcentage du coefficient de déséquilibre de liaisons maximum des valeurs possibles aux fréquences alléliques données

TABLEAU III

Estimations du polymorphisme d'haplotype dans la région
chromosomale 19q13.2

Nombre d'haplotypes	Polymorphismes				Survénue tardive estimée				Survénue précoce estimée				TOTAL estimé		Attendu	
	DIS113	APOE	APOC1	APOC11	Survénue tardive estimée		Survénue précoce estimée		Sujets Témoins		Sujets Témoins		Sujets Témoins			
					Sujets	Témoins	Sujets	Témoins	Sujets	Témoins	Sujets	Témoins	Sujets	Témoins		
1	S	4	2	L	.043	.000	.050	.000	.055	.000	.067	.000	.016	.007	.002	
2	L	4	2	L	.103	.000	.048	.000	.032	.032	.032	.016	.07	.011	.003	
3	S	4	2	S	.040	.000	.063	.032	.107	.097	.097	.079	.011	*	.007	
4	L	4	2	S	.062	.053	.133	.107								
5	S	3	1	L	.103	.119	.052	.051	.097	.085	.097	.085	.052			
6	S	3	1	S	.214	.162	.261	.223	.215	.200	.215	.200	.176			
7	S	3	2	L	.014	.000	.026	.000	.006	.000	.006	.000	.017			
8	S	3	2	S	.000	.013	.106	.000	.051	.051	.051	.007	.056			
9	L	3	1	L	.083	.053	.074	.169	.073	.073	.073	.104	.081			
10	L	3	1	S	.308	.456	.172	.281	.251	.368	.251	.368	.271			
11	L	3	2	L	.014	.000	.000	.000	.012	.000	.012	.000	.026			
12	L	2	2	L	.000	.039	.000	.002	.000	.029	.000	.029	.005			
13	L	2	2	S	.000	.018	.000	.039	.000	.029	.000	.029	.016			
14	S	2	2	L	.014	.000	.000	.029	.004	.012	.004	.012	.003			
15	S	2	2	S	.000	.088	.015	.069	.010	.072	.010	.072	.010			
H					.82	.74	.87	.82	.85	.79						
PIC					.80	.71	.86	.80	.84	.77						
Nombre de chromosomes					72	76	68	72	140	148						

H = degré d'hétérozygotie ; PIC = Information Contenue dans le Polymorphisme

Les fréquences attendues ont été calculées pour des témoins présentant le produit correspondant aux fréquences alléliques pour chaque polymorphisme.

Differences entre les fréquences d'haplotypes estimées et les fréquences d'haplotypes attendus, dans l'hypothèse d'un équilibre des liaisons (* p<0.01)

Estimation des "odds ratio" pour des sujets ayant au moins un allèle ε4 avec le polymorphisme de l'allèle D19S178 court ou le polymorphisme de l'allèle APO CII long

TABLEAU IV

		Maladie d'Alzheimer	Témoins	"Odds ratio"	p
Survenue tardive	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	36	.38	14.23	< .002
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long	.28 .31	.03 .00	∞	< .0002
Survenue précoce	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	34	.36	8.68	< .0006
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long	.44 .21	.08 .06	4.41	< .06
Total	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	70	.74	12.46	< .0001
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long	.26 .36	.03 .05	9.72	< .00001

REVENDICATIONS

1. Utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.
5
2. Utilisation selon la revendication 1 des marqueurs APOE, APO CII et/ou D19S178.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2 des marqueurs APOE, D19S178 et APO CII.
10
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les marqueurs sont l'allèle APOE ε4, l'allèle D19S178 court et l'allèle APO CII long.
15
5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle D19S178 court comporte moins de 167 ± 4 , notamment moins de 167 nucléotides.
20
6. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle APO CII long comporte plus de 30 ± 3 , notamment plus de 30 motifs répétitifs (CA).
25
7. Méthode de diagnostic de la maladie d'Alzheimer, caractérisé en ce que l'on recherche dans un échantillon biologique d'un patient la présence de deux au moins des marqueurs suivants : allèle APOE ε4, allèle D19S178 court, et allèle APO CII long.
30
8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée par les étapes suivantes :
 - a) mise en contact de l'échantillon biologique contenant de l'ADN avec un couple d'amorces spécifiques permettant l'amplification de tout ou partie des gènes APOE, D19S178 et/ou APO CII, l'ADN humain contenu dans l'échantillon ayant été éventuellement rendu accessible à l'hybridation et dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN humain contenu dans l'échantillon biologique ;
35

b) amplification de l'ADN humain ;
c) révélation des produits d'amplification par les techniques appropriées ;

5 d) détection de la présence éventuelle des allèles APOE ε4, D19S178 court et APO CII long par les techniques appropriées.

10 9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que la présence des allèles APOE ε4, D19S178 court et APO CII long est mise en évidence par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

10. Nécessaire pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - des couples d'amorces spécifiques de deux au moins des gènes APOE, D19S178 et APO CII,

- les réactifs nécessaires pour effectuer une amplification d'ADN,

20 - éventuellement les réactifs permettant la détection des allèles APOE ε4, D19S178 court et/ou APO CII, par exemple des réactifs nécessaires à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des fragments après migration,

- éventuellement des standards de référence constitués par les allèles sauvages des gènes mutants.

25 11. Produits d'amplification de tout ou partie d'au moins deux gènes choisis parmi APOE, APO CII et D19S178.

30 12. Composition de diagnostic constitués d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, APO CII et D19S178.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>THE LANCET, vol. 342, no. 8882, 20 November 1993 LANCET, LONDON, UK, pages 1308-1309, N. ANWAR ET AL. 'Apolipoprotein E-epsilon4 allele and Alzheimer's disease' see page 1308, right column, line 5 - line 8 see page 1308, right column, line 19 - line 30</p> <p>----</p> <p>-/-</p>	1-5, 7-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

6 June 1995

21.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 95/00259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANNALS OF NEUROLOGY, vol. 31, no. 2, February 1992 LISSLE, BROWN AND COMPANY, BOSTON, MA, US;;, pages 223-227, G.D. SCHELLENBERG ET AL. 'Genetic association and linkage analysis of the apolipoprotein CII locus and familial Alzheimer's disease' cited in the application The whole ---	1-12
Y	NEUROLOGY, vol. 43, no. 8, August 1993 EDGEWELL COMMUN. INC., DULUTH, MINN, US;;, pages 1467-1472, A.M. SAUNDERS ET AL. 'Association of apolipoprotein E allele epsilon with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease' cited in the application The whole ---	1-12
Y	SCIENCE, vol. 261, 13 August 1993 AAAS, WASHINGTON, DC, US;;, pages 921-923, E.H. CORDER ET AL. 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer disease in late onset families' cited in the application The whole ---	1-12
Y	PROC. NATL. ACAD SCI., vol. 90, no. 5, 1 March 1993 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;;, pages 1977-1981, W.J. SCHRITTMACHER ET AL. 'Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease' cited in the application The whole ---	1-12
A	AM J. HUMAN GENETICS, vol. 44, no. 3, March 1989 AM. SOC. HUM. GENET., UNIV. CHICAGO PRESS, US;;, pages 388-396, J.L. WEBER AND P.E. MAY 'Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction' cited in the application The whole ---	1-12
3	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten nal Application No
PCT/FR 95/00259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 58, no. 1-4, 1991 KARGER, NEW YORK, US;; pages 751-784, H.H. ROPERS AND M.A. PERICAK-VANCE 'Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 19' cited in the application see page 756, right column, line 1 - line 9 see page 770, line 21 - line 22 ----	1-12
P,A	WO-A-94 09155 (DUKE UNIVERSITY) 28 April 1994 The whole ----	1-12
P,X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 3, no. 4, April 1994 OXFORD UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, UK;; pages 569-574, M.-C. CHARTIER-HARLIN ET AL. 'Apolipoprotein E, epsilon4 allele as a major risk factor for sporadic early and late onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region' The whole -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte. n Application No

PCT/FR 95/00259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9409155	28-04-94	AU-B-	5350094	09-05-94
		CA-A-	2142300	28-04-94
		CN-A-	1092525	21-09-94
		EP-A-	0625212	23-11-94
		JP-T-	7502418	16-03-95
		NO-A-	951383	07-04-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00259

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>THE LANCET, vol. 342, no. 8882, 20 Novembre 1993 LANCET, LONDON, UK, pages 1308-1309, N. ANWAR ET AL. 'Apolipoprotein E-epsilon4 allele and Alzheimer's disease' voir page 1308, colonne de droite, ligne 5 - ligne 8 voir page 1308, colonne de droite, ligne 19 - ligne 30 ----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-5, 7-12

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Juin 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21.06.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No PCT/FR 95/00259

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ANNALS OF NEUROLOGY, vol. 31, no. 2, Février 1992 LISSLE, BROWN AND COMPANY, BOSTON, MA, US;;, pages 223-227, G.D. SCHELLENBERG ET AL. 'Genetic association and linkage analysis of the apolipoprotein CII locus and familial Alzheimer's disease' cité dans la demande * En entier * ---	1-12
Y	NEUROLOGY, vol. 43, no. 8, Août 1993 EDGEWELL COMMUN. INC., DULUTH, MINN, US;;, pages 1467-1472, A.M. SAUNDERS ET AL. 'Association of apolipoprotein E allele epsilon with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease' cité dans la demande * En entier * ---	1-12
Y	SCIENCE, vol. 261, 13 Août 1993 AAAS, WASHINGTON, DC, US;;, pages 921-923, E.H. CORDER ET AL. 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer disease in late onset families' cité dans la demande * En entier * ---	1-12
Y	PROC. NATL. ACAD SCI., vol. 90, no. 5, 1 Mars 1993 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;;, pages 1977-1981, W.J. SCHRITTMACHER ET AL. 'Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease' cité dans la demande * En entier * ---	1-12
A	AM J. HUMAN GENETICS, vol. 44, no. 3, Mars 1989 AM. SOC. HUM. GENET., UNIV. CHICAGO PRESS, US;;, pages 388-396, J.L. WEBER AND P.E. MAY 'Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction' cité dans la demande * En entier * ---	1-12
3	----- -/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 95/00259

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 58, no. 1-4, 1991 KARGER, NEW YORK, US;, pages 751-784, H.H. ROPERS AND M.A. PERICAK-VANCE 'Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 19' cité dans la demande voir page 756, colonne de droite, ligne 1 - ligne 9 voir page 770, ligne 21 - ligne 22 ---	1-12
P,A	WO-A-94 09155 (DUKE UNIVERSITY) 28 Avril 1994 en entier ---	1-12
P,X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 3, no. 4, Avril 1994 OXFORD UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, UK;, pages 569-574, M.-C. CHARTIER-HARLIN ET AL. 'Apolipoprotein E, epsilon4 allele as a major risk factor for sporadic early and late onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region' * En entier * -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derr. : Internationale No

PCT/FR 95/00259

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9409155	28-04-94	AU-B- 5350094	09-05-94
		CA-A- 2142300	28-04-94
		CN-A- 1092525	21-09-94
		EP-A- 0625212	23-11-94
		JP-T- 7502418	16-03-95
		NO-A- 951383	07-04-95

